



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 06 169.6

Anmeldetag: 08. Februar 1999

Anmelder/Inhaber: BioInside Gesellschaft für Biodiagnostik,
Auftragsforschung und Consulting mbH,
Teltow/DE

Bezeichnung: Testkit und Verfahren zum quantitativen Nachweis
von gentechnisch veränderter DNS in Lebens-
mitteln mittels fluoreszenzgekoppelter PCR

IPC: C 12 Q, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Oktober 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Brand

5 **Testkit und Verfahren zum quantitativen Nachweis
von gentechnisch veränderter DNS in Lebensmitteln
mittels fluoreszenzgekoppelter PCR**

10 **Beschreibung**

15 Die Erfindung betrifft einen Testkit und ein Verfahren
zum qualitativen und quantitativen Nachweis von DNS in
Lebensmitteln und Lebensmittelprodukten, die aus gen-
technisch veränderten Organismen (GVO) stammt. Weiter-
hin betrifft die Erfindung die Verwendung spezieller
Primer- und Sonden-DNS-Sequenzen für diesen Nachweis.

20 Die Herstellung von Lebensmitteln beinhaltet die
Sicherstellung deren Qualität und die Information der
Verbraucher über die Bestandteile und die Zusammen-
setzung von Lebensmittelprodukten.

25 Seit September 1998 gilt in Europa die Verordnung Nr.
1139/98 des Rates der EG, nach der Lebensmittel
gekennzeichnet werden müssen, in denen DNS aus gen-
technisch veränderten Organismen (GVO-DNS) enthalten
ist. In derselben Verordnung wird für die Zukunft die
30 Festlegung eines unteren Schwellenwertes für die GVO-
DNS-Menge empfohlen, ab welchem Lebensmittel
gekennzeichnet werden müssen. Die Überprüfung der
Verordnung in Bezug auf Nachweisbarkeit von GVO-DNS und

Einhaltung des Schwellenwertes erfordert ein quantitatives GVO-DNS-Nachweissystem, das mit hoher Sensitivität und Reproduzierbarkeit arbeitet.

5 Der Nachweis von GVO-DNS wird zur Zeit mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) durchgeführt (Hupfer et al. 1997, Z Lebensm Unters Forsch 205: 442-445). Für den quantitativen Nachweis von GVO-DNS wird die Methode der quanti-
10 tativen kompetitiven PCR angewendet (Studer et al. 1998, Z Lebensm Unters Forsch 207: 207-213).

Bei der quantitativen kompetitiven PCR werden die Target-Gene in Gegenwart von definierten Mengen an
15 Standard-DNS amplifiziert. Die Standard-DNS wird von denselben Primern amplifiziert wie die Target-Gene. Die entstehenden PCR-Amplifikate für die Target-Gene und für die Standards unterscheiden sich in der Größe und lassen sich deshalb gel-elektrophoretisch auftrennen.
20 Nach erfolgter PCR werden die PCR-Produkte angefärbt, gel-elektrophoretisch aufgetrennt, und die Mengen an Target-Gen-Amplifikaten und Standard-DNS-Amplifikaten werden densitrometrisch bestimmt. Da Standard-DNS-Kopien in definierten Mengen zugegeben werden, läßt sich die Menge an Target-Gen-Kopien durch den Vergleich von Standard-PCR-Produkten und Target-PCR-Produkten abschätzen.

Obwohl sich mittels PCR gentechnisch veränderte DNS
30 generell nachweisen läßt, und obwohl sich mittels quantitativer kompetitiver PCR deren Menge auch quantitativ bestimmen läßt, sind diese Methoden für die Routine-Analyse von Produkten, insbesondere von Lebensmitteln, schlecht geeignet. Die Methoden sind ungenü-
35 gend automatisierbar, bergen die Gefahr von PCR-

Produkt-Kontaminationen (falsch-positive Ergebnisse) und liefern Ergebnisse von ungenügender Genauigkeit.

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, ein Verfahren zum Nachweis von gentechnisch veränderter DNS in Lebensmitteln bereitzustellen, mit dem eine kontaminationsfreie, hoch-automatisierbare und hoch reproduzierbare Analyse möglich ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Anwendung der fluoreszenzgekoppelten PCR und den Einsatz spezieller Primer- und Sondenkombinationen wie in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Bei der fluoreszenz-gekoppelten PCR handelt es sich um eine an sich bekannte Methode. So wird in US 5,210,015 und US 5,487,972 (TaqMan[®]) eine PCR-Reaktion beschrieben, an der drei Oligonukleotide beteiligt sind, zwei Primer und eine fluorogene Sonde. Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3' Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizen-Strang der DNS. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde, die zwischen den Primern positioniert ist und wird von der Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase geschnitten. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe - und damit auch der FET - zwischen

Reporter und Quencher unterbrochen. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch, da nicht 100% ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase aktiviert ist. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe kann schließlich mit Hilfe kommerzieller Geräte, z. B. ABIPRISM 7700 der Firma Perkin-Elmer Applied Biosystems Division (PEABD) im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfaßt werden.

Der erfindungsgemäße Nachweis erfolgt nun, indem zunächst die Gesamt-DNS nach dem Fachmann an sich bekannten Methoden (vgl. Zimmermann et al, 1998, Z Lebensm Unters Forsch A 207 : 81-90) aus der Lebensmittelprobe extrahiert wird und - wie in Abb. 1 dargestellt -

- a) die Menge an Transgen in der Gesamt-DNS bestimmt wird, indem eine PCR-Reaktion mit einer Transgen-spezifischen fluoreszenzmarkierten Sonde S1 und zwei Transgen-spezifischen Primern P1 und P2 in einem ersten Reaktionsgefäß durchgeführt und die Änderung der Fluoreszenzstrahlung im Vergleich zur Kontrolle gemessen wird, wobei als interne Amplifikationskontrolle (IAK) für die Transgenbestimmung im ersten Reaktionsgefäß neben den Primern P1 und P2 und einer fluoreszenzmarkierten Sonde S2 ein synthetisches Genfragment eingesetzt wird (Target IAK DNS), das zwei Bindungsstellen für die Primer P1 und P2 und eine Bindungsstelle für die fluoreszenzmarkierte Sonde S2 besitzt, die sich sowohl in ihrer Sequenz von der Sonde S1 unterscheidet als auch mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist als die Sonde S1,

b) ein Referenzgen ausgewählt und die Menge an Referenzgen in der Gesamt-DNS bestimmt wird, indem eine PCR-Reaktion mit einer Referenzgen-spezifischen fluoreszenzmarkierten Sonde S3 und zwei Referenzgen-spezifischen Primern P3 und P4 in einem zweiten Reaktionsgefäß durchgeführt und die Änderung der Fluoreszenzstrahlung im Vergleich zur Kontrolle gemessen wird, wobei als interne Amplifikationskontrolle (IAK) für die Referenzgen-Bestimmung im zweiten Reaktionsgefäß neben den Primern P3 und P4 und der fluoreszenzmarkierten Sonde S2 ein synthetisches Genfragment eingesetzt wird (Referenz IAK DNS), das zwei Bindungsstellen für die Primer P3 und P4 und eine Bindungsstelle für die fluoreszenzmarkierte Sonde S2 besitzt, die mit der fluoreszenzmarkierten Sonde S2 im Targetgen-System identisch ist, sich aber in der Sequenz und im Fluoreszenzfarbstoff von der Sonde S3 unterscheidet,

und letztlich aus dem Verhältnis der Menge an Transgen und der Menge an Referenzgen der Anteil an gentechnisch veränderter DNS berechnet wird.

Bei der fluorezenz-gekoppelten PCR korreliert die Menge an untersuchten Genkopien mit einer gemessenen Fluoreszenzänderung im Vergleich zu einer Kontroll-PCR-Reaktion ohne DNS. Basierend auf der gemessenen Fluoreszenzänderung ist es damit möglich, auf die Menge an eingesetzter Proben-DNS zurückzurechnen.

Zur näheren Erläuterung der Erfindung ist nachfolgend definiert, was im Sinne der Erfindung unter einzelnen Begriffen zu verstehen ist:

Primer

Primer sind DNS-Oligonukleotide. Unter den entsprechenden Bedingungen hybridisieren sie nur an die komplementäre DNS-Sequenz des zu detektierenden Genfragments. Sie dienen als Startpunkte für die Initiation der DNS-Synthese durch das Enzym DNS-Polymerase. Die Lage zweier Primer innerhalb eines Gens bestimmt, welches Genfragment mittels PCR vervielfältigt und nachfolgend detektiert werden kann.

Sonden

Sonden (engl.: probe) sind DNS-Oligonucleotide, an die Reporter-Farbstoffe gekoppelt sind. Unter den entsprechenden Bedingungen hybridisieren sie nur an die komplementäre DNS-Sequenz des zu detektierenden Genfragments.

Fluoreszenz-gekoppelte PCR

Bei der fluoreszenz-gekoppelten PCR sind die Sonden zwischen den Primern lokalisiert. In Gegenwart einer die Fluoreszenzstrahlung anregenden Lichtquelle führt eine erfolgreiche PCR-Reaktion zur Änderung der Sondenfluoreszenz. Die Änderung der Sondenfluoreszenzstrahlung korreliert mit der Menge an entstehenden PCR-Produkten und somit mit der Menge an ursprünglich untersuchten Genkopien. Anhand der Fluoreszenzstrahlung ist die Menge des zu detektierenden Gens kalkulierbar (Heid et al. 1996, Genome Methods 6: 986-994, Wittwer et al. 1997 BioTechniques 22: 130-138).

Transgen

Als Transgen wird eine Nukleotidsequenz definiert, die vom Menschen manipuliert wurde, z. B. indem sie von einem Organismus in einen anderen Organismus, in dem

sie natürlicherweise nicht vorhanden ist, transformiert wurde.

Referenzgen

5 Als Referenzgen wird eine Nukleotidsequenz definiert, die sich in allen relevanten Varianten einer zu detektierenden Organismenart befindet. Das Referenzgen dient als Bezugsgröße bei der relativen Quantifizierung von Transgenen. Die Menge an Referenzgen, somit deren
10 Kopienzahl, wird bei der Quantifizierung als 100% definiert und die Kopienzahl des Transgens wird anschließend dazu in Beziehung gesetzt.

Target-DNS

15 Target-DNS ist die Nukleotid-Sequenz, die von einem PCR-System erkannt und amplifiziert wird. Die Nukleotid-Sequenzen können verschiedenen Ursprungs sein. Beim Referenzgen handelt es um die genomische DNS eines bestimmten Genfragments, das in allen relevanten
20 Varianten einer Art (z. B. Soja oder Mais) vorkommt. Beim Transgen handelt es sich um die gentechnisch veränderte DNS eines bestimmten DNS-Fragments, deren Existenz nachgewiesen werden soll. Bei den Target-IAK-DNS handelt es sich um erfindungsgemäße synthetische
25 DNS-Fragmente, die einerseits die Nukleotidsequenzen der spezifischen Primer und andererseits die Nukleotidsequenz der erfindungsgemäßen universellen Sonde S2 beinhalten.

Interne Amplifikationskontrolle (IAK)

30 Die interne Amplifikationskontrolle kontrolliert die Effizienz der PCR-Reaktion einer bestimmten Primerkombination. Sie besteht aus der erfindungsgemäßen Target-IAK-DNS bzw. der erfindungsgemäßen Referenz IAK DNS und
35 der erfindungsgemäßen universellen Sonde S2.

Um die Menge an gentechnisch-veränderter DNS in Lebensmitteln bestimmen zu können, werden also erfindungsgemäß die folgenden Parameter gemessen (vgl. Abb. 1):

5

(1) Es wird die Menge an Transgen in der Gesamt-DNS mit Hilfe der Primer P1 und P2 und der Sonde S1 gemessen. Diese Messung findet in Reaktionsgefäß (A) statt.

10

(2) Es wird die Menge an Referenzgen in der Gesamt-DNS mit Hilfe der Primer P3 und P4 und der Sonde S3 gemessen. Diese Messung findet in Reaktionsgefäß (B) statt.

15

Das Verhältnis von Transgen zu Referenzgen ergibt den Anteil an gentechnisch veränderter DNS an der DNS einer bestimmten Organismenart; wobei die Menge an Referenzgen die Quantität der relevanten zu untersuchenden DNS reflektiert.

20

(3) In beiden Reaktionsgefäßen (A) und (B) wird mit Hilfe der Primer P1 bis P4, der Sonde S2 und den erfindungsgemäßen Target-IAK-DNS und Referenz-IAK-DNS die Effizienz der jeweiligen PCR-Reaktion gemessen.

Die spezifischen internen Amplifikationskontrollen (IAK) bestehen aus den erfindungsgemäßen spezifischen Primern P1 und P2 für das Transgen und P3 und P4 für das Referenzgen, der erfindungsgemäßen universellen Sonde S2 und der erfindungsgemäßen Target-IAK-DNS für das Transgensystem und der erfindungsgemäßen Referenz-IAK-DNS für das Referenzgensystem. Die IAKs ermöglichen die Kontrolle der DNS-Qualität. Dabei wird die PCR-Effizienz sowohl des Transgen- als auch des Referenzgensystems gemessen.

30

Die Bereitstellung der vier erfindungsgemäßen Primer-/Sondensysteme (vgl. Abb. 1) erlaubt die Kontrolle sowohl der DNS Quantität als auch deren Qualität und

schaft damit die notwendige und hinreichende Voraussetzung für eine DNS-Quantifizierung.

Erfindungsgemäß besteht die Möglichkeit, zwei PCR-Systeme pro Reaktionsgefäß parallel zu messen, da die Sonden für beide Systeme mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben markiert sind. Beispielsweise können die Sonden S1 und S3 mit dem gleichen Reporter-Farbstoff und S2 mit einem anderen Reporter-Farbstoff markiert sein.

In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung können so z. B. das Roundup Ready Soja-Gen (RRS-Gen) und das Bt-176 Mais-Gen als in Lebensmitteln häufig vorkommende Transgene nachgewiesen werden. Aber auch für andere Mais-Transgene, wie z. B. das Transgen im Bt-11-Mais, oder für den Nachweis des 35 S CMV Promoters als Screening-Verfahren zum unspezifischen Nachweis von GVO-DNS oder für alle zukünftig in den Lebensmittel-Markt eingeführten Transgene ist das erfindungsgemäße Nachweisverfahren einsetzbar und sehr gut geeignet.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden zum erfindungsgemäßen Nachweis des RRS-Gens, das die NS-Sequenz SEQ ID NO. 1 aufweist und nach Experteschätzungen in 20000 bis 30000 Lebensmitteln enthalten ist, als Primer P1 und P2 die neuen Sequenzen SEQ ID NO. 3 oder SEQ ID NO. 3a und SEQ ID NO. 4 oder SEQ ID NO. 4a oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten eingesetzt, die chemisch-synthetisch hergestellt wurden. Als Sonde S1 hat sich die neue NS-Sequenz SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 2a oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten als besonders geeignet erwiesen. Die Herstellung erfolgte ebenfalls auf chemisch-synthetischem Wege. Die Sonde S1

ist am 5'-Ende oder am 3'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff, vorzugsweise einem Fluoreszeinderivat ausgewählt aus 6-Carboxy-Fluoreszein, Tetra-chloro-6-carboxy-Fluoreszein, 2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-Fluoreszein, Hexachloro-6-carboxy-Fluoreszein markiert. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform wird als Markierung 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) eingesetzt. Als Quencher am anderen Sequenzende findet vorzugsweise ein Rhodamin-derivat, ganz besonders bevorzugt 6-Carboxytetramethylrhodamin, Anwendung.

Als Referenzgen für den erfindungsgemäßen Nachweis des RRS-Gens hat sich Lektin als besonders geeignet erwiesen. Wird Lektin (vgl. SEQ ID NO. 11) als Referenzgen verwendet, so finden in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung als Primer P3 und P4 die Sequenzen SEQ ID NO. 6 oder SEQ ID NO. 6a und SEQ ID NO. 7 oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten Anwendung. Als Sonde S3 hat sich die neue NS-Sequenz SEQ ID NO. 5 oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten als besonders geeignet erwiesen. Die Sonde S3 ist wie die Sonde S1 am 5'-Ende oder am 3'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff und am anderen Sequenzende mit einem Quencher markiert.

Erfindungsgemäß werden zur Transgen-Bestimmung und zur Referenzgenbestimmung interne Amplifikationskontrollen verwendet. Dabei haben sich die NS-Sequenzen SEQ ID NO. 8 oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten als besonders geeignete interne Amplifikationskontrollen für die Transgenbestimmung (Target IAK DNS) und die NS-Sequenz SEQ ID NO. 10 oder SEQ ID NO. 10a oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten als besonders

geeignete interne Amplifikationskontrollen für die Referenzgenbestimmung erwiesen.

5 Als universelle Sonde S2 werden in einer bevorzugten Ausführungsform die AS-Sequenz SEQ ID NO. 9 oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten eingesetzt. Die Sonde S2 ist am 5'-Ende oder am 3'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff, vorzugsweise einem Fluoreszeinderivat ausgewählt aus 6-Carboxy-Fluoreszein, Tetrachloro-6-carboxy-Fluoreszein, 10 2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-Fluoreszein, Hexachloro-6-carboxy-Fluoreszein markiert, der zu den Sonden S1 und S3 verschieden ist, beispielsweise mit Tetrachloro-6-carboxy-Fluoreszein. Am anderen Sequenz-ende ist die Sonde mit einem Quencher, vorzugsweise 15 einem Rhodaminderivat, markiert, das mit dem der Sonden S1 und S3 identisch ist. Als besonders geeignet hat sich hierbei 6-Carboxytetramethylrhodamin erwiesen.

20 Gegenstand der Erfindung sind nicht nur die in der Beschreibung und in den Ansprüchen konkret genannten Primer- und Sondensequenzen, sondern auch deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltenen Varianten, sofern sie zu mindestens 80 % zu der konkret genannten Sequenz homolog sind und eine ähnlich gute Testspezifität und Testsensitivität gewährleisten wie die konkret genannten Sequenzen.

30 Alle erfindungsgemäßen Primer- und Sondensequenzen können chemisch-synthetisch nach dem Fachmann gut bekannten Methoden hergestellt werden. Bis auf die RRS-Gen-Sequenz, die Lektin-Sequenz und die Primer-Sequenz NO. 6 handelt es sich um neue Sequenzen. Die Sequenzen sind im Sequenzprotokoll, das Bestandteil der Beschreibung 35 ist, dargestellt.

Mit dem erfindungsgemäßen hochspezifischen und hochsensitiven Verfahren ist es durch den Verfahrensaufbau und durch die speziellen Primer- und Sondenkombinationen möglich, erstmals für jede Produktuntersuchung die Genauigkeit der Untersuchung und die GVO-DNS-Nachweisgrenze anzugeben.

Gegenstand der Erfindung ist neben dem Nachweisverfahren auch der zugehörige Testkit und die Verwendung besonders vorteilhafter Primer- und Sondensequenzen gemäß der Ansprüche 14 bis 20.

Der Testkit umfaßt erfindungsgemäß eine Transgen-spezifische fluoreszenzmarkierte Sonde S1 und zwei Transgen-spezifische Primer P1 und P2, eine Referenzgen-spezifische fluoreszenzmarkierte Sonde S3 und zwei Referenzgen-spezifische Primer P3 und P4 sowie als interne Amplifikationskontrollen eine fluoreszenzmarkierte Sonde S2, die sich sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer Fluoreszenzmarkierung von den Sonden S1 und S3 unterscheidet, ein synthetisches Genfragment (Target IAK DNS) mit zwei Bindungsstellen für die Primer P1 und P2 und einer Bindungsstelle für die Sonde 2 und ein synthetisches Genfragment (Referenz IAK DNS) mit zwei Bindungsstellen für die Primer P3 und P4 und einer Bindungsstelle für die Sonde S2.

Es hat sich gezeigt, daß sich der Nachweis von GVO-DNS auch durch Fluoreszenz-gekoppelte PCR mittels Hybridisierungssonden und dem erfindungsgemäßen Verfahrensaufbau und mit hoher Genauigkeit durchführen läßt. Dazu werden anstelle der einzelnen Sonde S1 und der einzelnen Sonde S3 jeweils zwei fluorogene Sonden eingesetzt. Das 3' Ende einer Sonde ist mit einem

Donor-Farbstoff (Fluorescein-Derivat) markiert, während das 5' Ende der benachbarten Sonde mit einem Akzeptor-Farbstoff (z.B. Cy5, Light Cycler Red 640 oder Light Cycler Red 710) markiert ist. Die Nukleotidsequenzen der Sonden werden so gewählt, daß die Sonden in direkter Nachbarschaft mit der Target-DNS hybridisieren.

Dadurch entsteht eine direkte räumliche Nähe vom Donor-Farbstoff zum Akzeptorfarbstoff. Wird das Sondenpaar bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Donor-Farbstoffes auf den Akzeptorfarbstoff übertragen. Donor- und Akzeptorfarbstoffe werden so gewählt, daß sie bei verschiedenen Wellenlängen emitieren. Ein Anstieg der Emission des Akzeptorfarbstoffes kann nur gemessen, wenn nach Hybridisierung beider Sonden an die Target-DNS, die Anregungsenergie des Donorfarbstoffes auf den Akzeptorfarbstoff übertragen wurde. Je mehr PCR-Produkte entstehen, desto mehr Sondenpaare können hybridisieren, desto größer der Anstieg der Emissionstrahlung des Akzeptorfarbstoffes. Wie bei der TaqMan Technik, ist die Menge an entstehender Fluoreszenzstrahlung proportional zur Menge an entstehenden PCR-Produkte und damit zur Menge an untersuchter Ausgangs-DNS.

Nachfolgend soll die Erfindung an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden:

Ausführungsbeispiel:

Aus je 200 mg Sojamehl wurde Gesamt-DNS mittels CTAB-Methode isoliert (Zimmermann et al. 1998, Z Lebensm Unters Forsch A 207: 81-90). Die Ausbeute betrug etwa 500 μ g DNS je 200 mg Sojamehl. Die isolierte DNS wurde in PCR-Reaktionen in Gegenwart des Trans-Gen-Systems oder des Referenz-Gen-Systems analysiert. Dazu wurden die im Folgenden beschriebenen Komponenten und Verfahren benutzt. Alle Komponenten, inklusive Primer und Sonden, wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland, bezogen. Herstellung der TaqMan-PCR-Reaktionsgemische, Durchführung der PCR-Reaktion und Bedienung des PCR-Heizblocks bzw des Fluoreszenzdetektors (PEABD Model 7700 oder Model LS50B) erfolgte nach Anweisungen des Geräteherstellers (User's Manual, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, PE Applied Biosystems Division, Foster City, USA 1997, bzw Users Manual, PE ABD LS50B).

Für die PCR-Amplifikation der isolierten DNS wurden folgende Komponenten in einem PCR Reaktionsgefäß für das Transgen-System bzw für das Referenz-Gen-System (PEABD Best.No. N80105080) gemischt. Es wurden PCR-Reaktionen von 50 μ l Volumen pro Reaktion durchgeführt.

Transgen-System (Roundup Ready System / RRS)

Reaktionskomponente	Volumen (μ l)	Endkonzentration
DNS	5, 000	
H ₂ O	16,750	
10 x Puffer A	5, 000	1 x
25 mM Mg ₂ Cl	7, 000	3, 5 mM
15 μ M RRS Primer P1	2, 000	600 nM
15 μ M RRS Primer P2	2, 000	600 nM
4 μ M RRS Sonde S1	2, 000	160 nM
2 μ M IAK Sonde S2	3, 000	120 nM

	dATP	0, 400	200 μ M
	dCTP	0, 400	200 μ M
	dGTP	0, 400	200 μ M
	dUTP	0, 800	400 μ M
5	5U/ μ l AmpliTaq Gold	0, 250	0,025 U/ μ l
	Polymerase		
	RRS IAK Target DNS	5, 000	100 Genkopien
	(109 dil Plasmid)		
	Gesamtvolumen	50,000	

10

Referenz-Gen-System (Lektin System)

	Reaktionskomponente	Volumen (μ l)	Endkonzentration
15	DNS	5, 000	
	H2O	14,750	
	10 x Puffer A	5, 000	1 x
	25 mM Mg2Cl	11,000	5, 5 mM
	15 μ M Lektin Primer P3	2, 000	600 nM
20	15 μ M Lektin Primer P4	2, 000	600 nM
	3 μ M Lektin Sonde S3	2, 000	120 nM
	2 μ M IAK Sonde S2	3, 000	120 nM
	dATP	0, 400	200 μ M
	dCTP	0, 400	200 μ M
25	dGTP	0, 400	200 μ M
	dUTP	0, 800	400 μ M
	5U/ μ l AmpliTaq Gold	0, 250	0,025 U / μ l
	Polymerase		
	Lektin IAK Target DNS	3, 000	100 Genkopien
30	(109 dil Plasmid)		
	Gesamtvolumen	50,000	

Folgendes Pipettierschema wurde zur Quantifizierung von Sojamehlproben angewendet (Reaktionsvolumen pro Reaktion: 50 μ l):

5 (i) NTC

Es wurden je 2 no template control (NTC) Reaktionen pro System (Transgen und Referenzgen) angestetzt. Diese Reaktionen enthalten ausser den IAKs keine DNS und ergeben in einem kontaminationsfreien Mileau keine Änderung der Reporter-fluoreszenzstrahlung der Sonden S1 und S3. Diese Negativkontrollen stellen sicher, daß keine falsch-positiven Ergebnisse erhalten werden.

(ii) Standardgeraden

15 Es wurden je 3 Reaktionen von 4 verschiedenen Verdünnungen von 100% transgener Roundup Ready DNS hergestellt. Bei den Verdünnungen wurde 10 ng, 5 ng, 0.5 ng und 0.25 ng DNS eingestetzt. Diese 12 Reaktionen wurden sowohl für das Transgen- als auch das Referenzgen-System nach o.g. Schema angesetzt. Zur Erstellung von 2 Standardgeraden, eine für das Transgen- und eine für das Referenzgen-System wurden also 24 PCR-Reaktionen angesetzt.

(iii) Probenuntersuchung

25 Es wurden je 2 Reaktionen von 2 verschiedenen Verdünnungen der DNS hergestellt, die aus Sojamehl mit einem 2% Gehalt an Roundup Ready Soja extrahiert worden war. Bei den Verdünnungen wurde 10 ng und 5 ng DNS eingesetzt. Diese 4 Reaktionen wurden sowohl für das Transgen- als auch das Referenzgen-System nach o.g. Schema angesetzt. Zur Untersuchung der Proben-DNS wurden also 8 PCR-Reaktionen angesetzt.

35 Die insgesamt 36 Reaktionsgefäße wurden nach Abschluß des Pipettierarbeiten zur Durchführung der PCR-Reaktion in den Heizblock des Sequenz-Detektor PEABD Model 7700

überführt. Folgendes Temperatur-Schema wurde zur PCR-Amplifikation eingestellt:

Temperatur-Bedingungen

10 min	95°C	Halten
15 sec	95°C	45
60 sec	60°C	Zyklen
2 min	25°C	Halten

Der Sequenzdetektor PEABD Model 7700 wurde nach Anweisungen des Herstellers gestartet.

PCR-Bedingungen waren durch Variation des Primer- und Sondendesigns, der Primer- und Sondenkonzentration, der MgCl₂ Konzentration und der Oligonukleotid-Annealing Temperatur optimiert worden.

Während der PCR Reaktion wurde von dem Fluoreszenzdetektor des Sequenz-Detektor PEABD Model 7700 die Änderung der Fluoreszenzstrahlung gemessen.

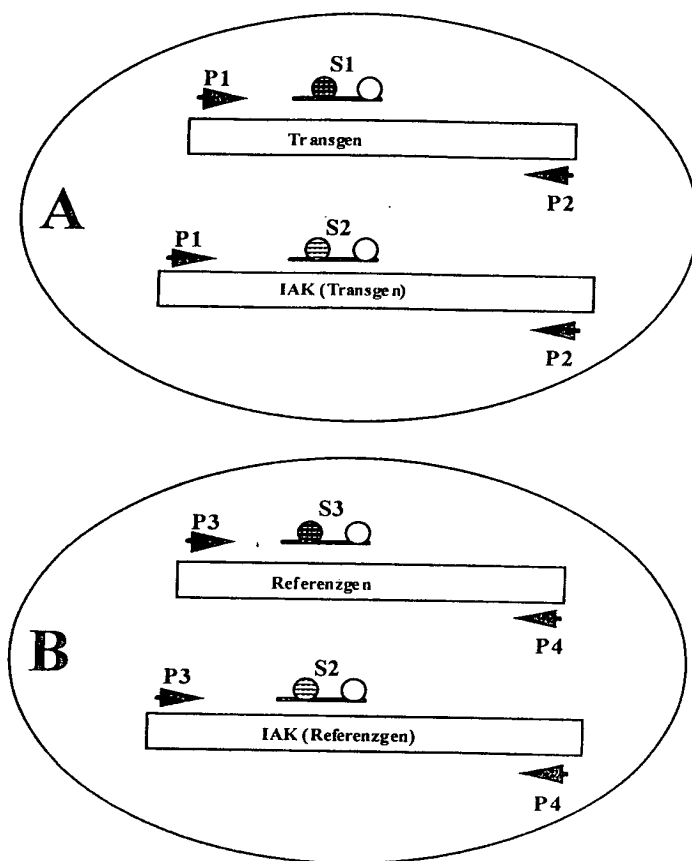
Als Maß für die Menge an entstehenden PCR-Produkten und somit an eingesetzten Target-Genkopien wird bei der TaqMan Technologie der sogenannte 'Threshold Cycle'-Wert oder Ct-Wert benutzt. Ct-Wert: Die bei der TaqMan-PCR stattfindende Hydrolyse der Fluoreszenzsonde führt zu einem Anstieg der Reporterfluoreszenzstrahlung von einem PCR-Zyklus zum Nächsten.

Die Zyklenzahl, bei der erstmals die Reporterfluoreszenzstrahlung über der Hintergrundstrahlung (NTC = no template control) des Systems liegt, wird 'Threshold Cycle' (Ct) genannt (Heid et al. 1996, Genome Methods 6:986-994). Hintergrundstrahlung (NTC) ist die Reporterfluoreszenzstrahlung in PCR Kontrollreaktionen, in denen keine Templat-DNS eingesetzt wurde.

Sowohl die Menge an freiwerdender Reporterstrahlung als auch der Ct-Wert sind proportional zu der Menge an

eingesetzten Target-Genkopien. Je mehr Genkopien eingesetzt werden, desto niedriger ist der resultierende Ct-Wert. In einem PCR-System mit 100%iger Effizienz nimmt der Ct-Wert mit jeder Verdopplung der Start-Genkopienzahl um einen Zyklus ab. Bei einer PCR-Reaktion die z.B. 45 PCR-Zyklen umfaßt, und bei der kein PCR-Produkt entsteht, wird der Ct-Wert per Definition 45 sein. Vor Beginn der Quantifizierung wurden die Ct-Werte und der Kurvenverlauf der Strahlungsänderung der IAK-Sonde S2 für beide Systeme kontrolliert. In Abwesenheit von PCR-Inhibitoren entsprechen Ct-Wert und Kurvenverlauf der Strahlungsänderung von S2 in den untersuchten Proben denen von S2 in den NTC. Da in einer solchen Situation die Anwesenheit von Proben-DNS die Effizienz der PCR nicht beeinflußt, können die erhaltenen Ct-Werte für die Quantifizierungsberechnungen verwendet werden. Sind die IAK-PCR-Reaktionen also von der Anwesenheit der Proben-DNS nicht beeinflußt, so wird mit der Quantifizierung begonnen. Sind die IAK-PCR-Reaktionen von der Proben-DNS beeinflußt, so müssen die PCR-Reaktionen mit besser gereinigter Proben-DNS wiederholt werden. Die erhaltene Ct-Werte für IAK-positive Werte wurden mit Hilfe der Standardgeraden in relative Genkopienzahlen umgerechnet. Das Verhältnis von relativer Transgen-Kopienzahl zu Referenz-Genkopienzahl ergibt den Anteil an GVO-DNS and der Gesamt-Soja-DNS der untersuchten Probe. Für die in diesem Beispiel untersuchte Sojamehl-Probe mit einem Anteil von 2% Roundup Ready Sojamehl ergab die Quantifizierung der Transgen-DNS versus Referenzgen-DNS tatsächlich 2, 00 % + / - 0, 30 %. Die Fehlerrechnung zur Bestimmung des Genauigkeits-bereiches wurde gemäß User Bullitin #2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, 1997, S. 34. Das hier beschriebene System erfüllt somit voll die gestellte Aufgabe.

Abb. 1



Sequenzprotokoll

5

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 1:

10

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LAENGE: 240 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

15

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

20

GTCTTCAAAG CAAGTGGATT GATGTGATAT CTCCACTGAC GTAAGGGATG
 ACGCACAATC CCACTATCCT TCGCAAGACC CTTCTCTAT ATAAGGAAGT
 TCATTTTCATT TGGAGAGGAC ACGCTGACAA GCTGACTCTA GCAGATCTTT
 CAAGAATGGC ACAAATTAAC AACATGGCTC AAGGGATACA AACCCCTAAT
 CCCAATTCCA ATTTCCATAA ACCCCAAGTT CCTAAATCTT

25

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

30

(A) LAENGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CAAGCTGACT CTAGCAGATC TTTC

40

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 2a:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LAENGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

45

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2a:

50

CCCACTATCC TTCGCAAGAC CCTT

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:
CATTTGGAGA GGACACGCTG A

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 3a:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3a:
CTGACGTAAG GGATGACGCA C

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 23 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:
GGGTTTGTAT CCCTTGAGCC ATG

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 4a:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LAENGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4a:
AAGATCTGCT AGAGTCAGCT TGTC

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LAENGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:
CTTCACCTTC TATGCCCTG ACAC

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LAENGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:
GCCCTCTACT CCACCCCAT CC

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 6a:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LAENGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6a:
CGTTGCCAGC TTCGCCGCTT C

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LAENGE: 23 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:
GAAGGCAAGC CCATCTGCAA GCC

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LAENGE: 126 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:
 CATTGGGAGA GGACACGCTG AGGACGTTTCG CCAATTTTCG CCTCCCACGT
 CTCACCGAGC GTGGTGTTTA CGAAGGTTTT ACGTTTTCCC GTATCCCCTT
 TCGTTTTTCAT CCAGTCTTTG ACAATC

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 8a:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LAENGE: 143 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8a:
 CTGACGTAAG GGATGACGCA CGGACGTTTCG CCAATTTTCG CCTCCCACGT
 CTCACCGAGC GTGGTGTTTA CGAAGGTTTT ACGTTTTCCC GTATCCCCTT
 TCGTTTTTCAT CCAGTCTTTG ACAAGCTGAC TCTAGCAGAT CTT

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LAENGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:
 TCGCCTCCCA CGTCTCACC A

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LAENGE: 150 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GCCCTCTACT CCACCCCAT CCGGACGTTT GCCAATTTTC GCCTCCCACG
TCTCACCAGAG CGTGGTGTTT ACGAAGGTTT TACGTTTTCC CGTATCCCCT
TTCGTTTTCA TCCAGTCTTT GACAATCGGC TTGCAGATGG GCTTGCCTTC

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 10a:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LAENGE: 149 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10a:

CGTTGCCAGC TTCGCCGCTT CGGACGTTTC CCAATTTTCG CCTCCCACGT
CTCACCAGAG GTGGTGTTTA CGAAGGTTTT ACGTTTTCCC GTATCCCCTT
TCGTTTTTCAT CCAGTCTTTG ACAATCGGCT TGCAGATGGG CTTGCCTTC

INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LAENGE: 250 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GGGAAAGTTA CAACTCAATA AGGTTGACGA AAACGGCACC CAAAACCCT
CGTCTCTTGG TCGCGCCCTC TACTCCACCC CCATCCACAT TTGGGACAAA
GAAACCGGTA GCGTTGCCAG CTTGCGCGCT TCCTTCAACT TCACCTTCTA
TGCCCCTGAC AAAAAAGGC TTGCAGATGG GCTTGCCTTC TTTCTCGCAC
CAATTGACAC TAAGCCACAA ACACATGCAG GTTATCTTGG TCTTTTCAAC

Patentansprüche

5 1. Verfahren zum quantitativen Nachweis von gentech-
nisch veränderter DNS (Transgen) in Lebensmitteln,
dadurch gekennzeichnet, daß
der Nachweis mittels fluoreszenz-gekoppelter PCR
erfolgt, dazu die Gesamt-DNS aus der Lebensmittel-
10 probe extrahiert wird und

a) die Menge an Transgen in der Gesamt-DNS bestimmt
wird, indem eine PCR-Reaktion mit einer Transgen-
spezifischen fluoreszenzmarkierten Sonde S1 und
zwei Transgen-spezifischen Primern P1 und P2 in
15 einem ersten Reaktionsgefäß durchgeführt und die
Änderung der Fluoreszenzstrahlung im Vergleich zur
Kontrolle gemessen wird, wobei als interne Amplifi-
kationskontrolle (IAK) für die Transgenbestimmung
im ersten Reaktionsgefäß neben den Primern P1 und
20 P2 und einer fluoreszenzmarkierten Sonde S2 ein
synthetisches Genfragment eingesetzt wird (Target
IAK DNS), das zwei Bindungsstellen für die Primer
P1 und P2 und eine Bindungsstelle für die
fluoreszenzmarkierte Sonde S2 besitzt, die sich
sowohl in ihrer Sequenz von der Sonde S1
5 unterscheidet als auch mit einem anderen Fluores-
zenzfarbstoff markiert ist als die Sonde S1,

b) ein Referenzgen ausgewählt und die Menge an
Referenzgen in der Gesamt-DNS bestimmt wird, indem
eine PCR-Reaktion mit einer Referenzgen-spezi-
fischen fluoreszenzmarkierten Sonde S3 und zwei
Referenzgen-spezifischen Primern P3 und P4 in einem
30 zweiten Reaktionsgefäß durchgeführt und die
Änderung der Fluoreszenzstrahlung im Vergleich zur
Kontrolle gemessen wird, wobei als interne Amplifi-
35

kationskontrolle (IAK) für die Referenzgen-Bestimmung im zweiten Reaktionsgefäß neben den Primern P3 und P4 und der fluoreszenzmarkierten Sonde S2 ein synthetisches Genfragment eingesetzt wird (Referenz IAK DNS), das zwei Bindungsstellen für die Primer P3 und P4 und eine Bindungsstelle für die fluoreszenzmarkierte Sonde S2 besitzt, die mit der fluoreszenzmarkierten Sonde S2 im Targetgen-System identisch ist, sich aber in der Sequenz und im Fluoreszenzfarbstoff von der Sonde S3 unterscheidet,

und letztlich aus dem Verhältnis der Menge an Transgen und der Menge an Referenzgen der Anteil an gentechnisch veränderter DNS berechnet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Roundup Ready Soja-Gen (RRS-Gen) als Transgen nachgewiesen wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Sonde S1 die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 2a oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten eingesetzt werden.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Primer P1 die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO. 3 oder SEQ ID NO. 3a und als Primer P2 die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO. 4 oder SEQ ID NO. 4a oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten eingesetzt werden.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
5 als Referenzgen Lektin mit der NS-Sequenz SEQ ID
NO. 11 eingesetzt wird.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1, 2 und 5,
dadurch gekennzeichnet, daß
10 als Sonde S3 die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO. 5
oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition
erhaltene Varianten eingesetzt werden.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1, 2 und 5,
dadurch gekennzeichnet, daß
15 als Primer P3 die NS-Sequenz SEQ ID NO. 6 oder SEQ
ID NO. 6a und als Primer P4 die NS-Sequenz SEQ ID
NO. 7 oder deren durch Deletion, Substitution oder
Addition erhaltene Varianten eingesetzt werden.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 3 und 6,
dadurch gekennzeichnet, daß
20 die Sonden S1 und S3 am 5'-Ende oder am 3'-Ende mit
einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff, vorzugs-
weise einem Fluoreszeinderivat ausgewählt aus 6-
Carboxy-Fluoreszein, Tetrachloro-6-carboxy-
Fluoreszein, 2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-
Fluoreszein, Hexachloro-6-carboxy-Fluoreszein mar-
kiert sind, vorzugsweise mit 6-Carboxy-Fluoreszein
30 (FAM), und am jeweils anderen Ende mit einem
Quencher, vorzugsweise einem Rhodaminderivat,
vorzugsweise mit 6-Carboxytetramethylrhodamin
(TAMRA), markiert sind.

9. Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß
als synthetisches Genfragment der internen Amplifi-
kationskontrolle für die Transgenbestimmung (Target
IAK DNS) die NS-Sequenz SEQ ID NO. 8 oder SEQ
ID NO. 8a oder deren durch Deletion, Substitution
oder Addition erhaltene Varianten eingesetzt
werden.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 5 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, daß
als synthetisches Genfragment der internen Amplifi-
kationskontrolle für die Referenzgenbestimmung
(Referenz IAK DNS) die NS-Sequenz SEQ ID NO. 10
oder SEQ ID NO. 10a oder deren durch Deletion,
Substitution oder Addition erhaltene Varianten
eingesetzt werden.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 9 und 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Sonde S2 die Nukleinsäure-Sequenz SEQ ID NO. 9
oder deren durch Deletion, Substitution oder
Addition erhaltene Varianten eingesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Sonde S2 am 5'-Ende oder am 3'-Ende mit einem
fluoreszenten Reporter-Farbstoff, vorzugsweise
einem Fluoreszeinderivat ausgewählt aus 6-Carboxy-
Fluoreszein, Tetrachloro-6-carboxy-Fluoreszein,
2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-Fluoreszein,
Hexachloro-6-carboxy-Fluoreszein markiert ist, der
verschieden zu dem der Sonden S1 und S3 ist, und
die Sonde S2 am anderen Sequenzende mit einem
Quencher, vorzugsweise einem Rhodaminderivat,

markiert ist, das mit dem der Sonden S1 und S3 identisch ist, vorzugsweise mit TAMRA.

5 13. Testkit zum quantitativen Nachweis von gentechnisch
veränderter DNS (Transgen) in Lebensmitteln mittels
fluoreszenz-gekoppelter PCR umfassend eine Trans-
gen-spezifische fluoreszenzmarkierte Sonde S1 und
zwei Transgen-spezifische Primer P1 und P2, eine
10 Referenzgen-spezifische fluoreszenzmarkierte Sonde
S3 und zwei Referenzgen-spezifische Primer P3 und
P4 sowie als interne Amplifikationskontrollen eine
fluoreszenzmarkierte Sonde S2, die sich sowohl in
ihrer Sequenz als auch in ihrer Fluoreszenzmar-
kierung von den Sonden S1 und S3 unterscheidet, ein
15 synthetisches Genfragment (Target IAK DNS) mit zwei
Bindungsstellen für die Primer P1 und P2 und einer
Bindungsstelle für die Sonde 2 und ein
synthetisches Genfragment (Referenz IAK DNS) mit
zwei Bindungsstellen für die Primer P3 und P4 und
20 einer Bindungsstelle für die Sonde S2.

25 14. Verwendung der NS-Sequenzen SEQ ID NO. 3 oder SEQ
ID NO. 3a und SEQ ID NO. 4 oder SEQ ID NO. 4a oder
deren durch Deletion, Substitution oder Addition
erhaltene Varianten als Primer im fluoreszenz-
gekoppelten PCR-Nachweis des RRS-Gens in
Lebensmitteln.

30 15. Verwendung nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet, daß
die NS-Sequenz SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 2a oder
deren durch Deletion, Substitution oder Addition
erhaltene Varianten als fluoreszenzmarkierte Sonde
eingesetzt werden.

5 16. Verwendung von Lektin als Referenzgen im fluoreszenz-gekoppelten PCR-Nachweis des RRS-Gens in Lebensmitteln und der NS-Sequenzen SEQ ID NO. 6 oder SEQ ID NO. 6a und SEQ ID NO. 7 oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten als Primer.

10 17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die NS-Sequenz SEQ ID NO. 5 oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten als fluoreszenzmarkierte Sonde eingesetzt werden.

15 18. Verwendung nach den Ansprüchen 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß als interne Amplifikationskontrolle (Target IAK DNS) die NS-Sequenz SEQ ID NO. 8 oder SEQ ID NO. 8a oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten eingesetzt werden.

20 19. Verwendung nach den Ansprüchen 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß als interne Amplifikationskontrolle (Referenz IAK DNS) die NS-Sequenz SEQ ID NO. 10 oder SEQ ID NO. 10a oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten eingesetzt werden.

25 30 20. Verwendung nach den Ansprüchen 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, daß die NS-Sequenz SEQ ID NO. 9 oder deren durch Deletion, Substitution oder Addition erhaltene Varianten als fluoreszenzmarkierte Sonde eingesetzt werden.

Zusammenfassung

5

Die Erfindung betrifft einen Testkit und ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von DNS in Lebensmitteln und Lebensmittelprodukten, die aus gentechnisch veränderten Organismen (GVO) stammt. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung spezieller Primer- und Sonden-DNS-Sequenzen für diesen Nachweis.

10

15